

ХІМІЧНІ ТЕХНОЛОГІЇ

УДК 582.284.3 : 577.151.5(045)

¹А.С. Бухало, д.б.н., проф.²О.М. Дуган, д.б.н., проф.³М.Р. Максимюк, к.х.н., доц.⁴В.М. Ліновицька, ст. викл.ФЕРМЕНТАТИВНА АКТИВНІСТЬ ВИЩОГО БАЗИДІАЛЬНОГО ГРИБА
GRIFOLA FRONDOSA¹Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України^{2,4}Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»³Національний авіаційний університет

E-mail: vmail@bigmir.net

Вивчено активність ферментів гідролітичного комплексу у процесі культивування вищого базидіального гриба Grifola frondosa на агаризованих середовищах. Показано вплив компонентів комплексних рідких живильних середовищ (пивне сусло, бурякова меляса, кукурудзяний екстракт, пептон, екстракт кормових дріжджів) на ферментативну активність ендо-1,4-β-глюканаз, екзоглюканаз та монофенолмонооксигеназ. Виявлено штамові особливості культур Gr. frondosa щодо активності ферментів.

Activity of enzymes of hydrolytic complex under cultivation of higher basidiomycetes mushroom of Grifola frondosa on agar mediums was studied. Influence of components of complex liquid nourishing mediums (beer wort, molasses, corn extract, peptone, extract of yeasts) on enzyme activities of endo-1,4-β-glucanase, exoglucanase and monophenolmonooxygenase were shown. Strains peculiarities of cultures of Gr. frondosa in relation to activity of enzymes were discovered.

Изучена активность ферментов гидролитического комплекса при культивировании высшего базидиального гриба Grifola frondosa на агаризованных средах. Показано влияние компонентов комплексных жидких питательных сред (пивное сусло, свекольная меласса, кукурузный экстракт, пептон, экстракт кормовых дрожжей) на ферментативную активность эндо-1,4-β-глюканазы, экзоглюканазы и монофенолмонооксигеназы. Вывявлено штаммовые особенности культур Gr. frondosa относительно активности ферментов.

Вступ

Вищі базидіальні лігнотрофні гриби – відомі продуценти лікувально-профілактичних та промислово цінних сполук. Ферменти є важливою групою біологічно активних речовин грибного походження, що можуть використовуватися в промисловості.

Велика кількість лігно-целюлозних відходів сільського господарства, деревопереробної та інших галузей промисловості привертає увагу до целюлолітичних та окислювальних ферментів.

Базидіоміцет *Grifola frondosa* є джерелом лікувально-профілактичних протеоглюканових та глюканових комплексів з протипухлинною, імуностимулюючою, антибактерійною, антивірусною (в тому числі проти вірусу імунодефіциту людини) дією. Вони здатні до регулювання кров'яного тиску та мають антидіабетичні властивості.

Аналіз досліджень і публікацій

Даних щодо ферментативної активності *Gr. frondosa* в літературі небагато. Переважно інформація присвячена протеїназам:

- металоендопептидаза [1];
- пептидил-лізин-металопептидаза [2];
- амінопептидази [3; 4];
- трегалоза-синтаза [5];
- карбоксилпротеїназа [6].

Відомості щодо активності ферментів лігноцелюлозного комплексу наведено лише при твердофазному культивуванні на пшеничній соломі в роботі [7].

Авторами встановлено наявність:

1) окислювальних ферментів:

- лактази;
- манган залежної пероксидази;
- манган незалежної пероксидази;

2) целюлозолітичних ферментів:

- 1,4- β -глюкозидази;
- ксиланази;
- 1,4- β -ксилозидази.

Дослідження гідролітичних ферментів різних класів є актуальним як для встановлення фізіологічних та біохімічних особливостей гриба *Gr. frondosa*, так і для вивчення можливості їх практичного застосування.

Мета роботи – виявлення та оцінювання спектру й активності гідролітичних ферментів у вищого базидіоміцету *Gr. frondosa* в поверхневій та глибинній культурі.

Для досягнення мети потрібно:

- визначити наявність ферментів різних класів у ході культивування на агаризованих середовищах;
- відібрати штами за спектром наявних ферментів;
- провести культивування глибинним способом на комплексних середовищах різного складу;
- оцінити ферментативну активність штамів залежно від умов глибинного культивування.

Методи дослідження

Об'єктом дослідження були вісім штамів *Gr. frondosa* (Dicks: Fr.) S. F. Gray, отриманих з колекції шапінкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України.

Наявність гідролітичних ферментів амілази, протеази (казеїназна активність), полігалактуронази, пектаттрансєлімінази, глюкозидази, уреази, ксиланази, ліпази та целюлази (КМЦ-активність) було визначено для всіх штамів за методиками, описаними П. Моліторисом [8].

Визначення наявності трьох окислювальних ферментів (лакази, тирозинази, пероксидази) проведено за допомогою якісних крапельних кольорових реакцій за температур +4, +20 та +28°C на різних агаризованих живильних середовищах [9]:

- картопляно-глюкозному агарі (КГА);
- агаризованому пивному суслі (СА);
- середовищі Норкранс (СН);
- синтетичному середовищі (СС).

Дослідження ферментативної активності в умовах глибинного культивування проводили в колбах Ерленмеєра на 250 мл, в умовах постійного перемішування за допомогою орбітальної качалки (60–70 об/хв), за температури (+28 \pm 1)°C.

Колби інокулювали отриманою попередньо фізіологічно активною глибинною культурою об'ємною часткою 10%. Як мінеральну основу для комплексних середовищ використовували розчин такого складу [9]: NH_4NO_3 – 3 г/дм³; KH_2PO_4 – 1 г/дм³; K_2HPO_4 – 1 г/дм³; $\text{MgSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0,6 г/дм³.

Для різних варіантів досліджень як ростові фактори та додаткові джерела азоту та вуглецю вносили в кількості еквівалентній 20 г/дм³ глюкози один з таких компонентів:

- пивне сусло;
- бурякову мелясу;
- кукурудзяний екстракт (КЕ);
- пептон;
- екстракт кормових дріжджів (ЕКД).

Контрольне середовище містило глюкозу.

Протягом культивування на комплексних живильних середовищах було визначено активність целюлолітичних ферментів [10]:

- ендо-1,4- β -глюканази за рівнем утворення глюкози в інкубованій суміші з 0,3% карбоксиметилцелюлози (КМЦ-активність);
- екзоглюканази за рівнем гідролізу фільтрувального паперу.

В обох випадках кількість глюкози, що утворювалась у результаті дії ферментів, а також рівень редуруючих речовин культурального фільтрату, визначалися методом Хагедорна – Йенсена [11].

Активність окислювального ферменту монофенолмонооксигенази встановлювали методом Бояркіна [12].

Відбір зразків відбувався кожену добу.

Результати дослідження

Проведені специфічні якісні кольорові реакції показали наявність ензимів, що визначалися, у всіх штамів *Gr. frondosa*. При цьому інтенсивність прояву ферментів у різних штамів відрізнялася (табл. 1).

Найбільший ступінь прояву позитивних реакцій спостерігався для амілази, целюлази, глюкозидази. У всіх штамів був характерним слабкий або помірний рівень прояву казеїнази, полігалактуронази, уреаз, ксиланази та частково пектаттранселімінази.

Визначення наявності групи окислювальних ферментів, притаманних для дереворуйнуючих вищих базидіоміцетів білої гнилі, до яких належить і *Gr. frondosa*, проводилося в умовах культивування на різних живильних агаризованих середовищах (табл. 2).

Таблиця 1

Якісні кольорові реакції на наявність гідролітичних ферментів у штамів *Gr. frondosa*

Штам	Амілаза	Ліпаза	Целюлаза	Казеїназа	Полігалактуроназа	Пектаттранселіміназа	Глюкозидаза	Ксиланаза	Уреаза
332	++	+++	++	+	+	+	++	+	+
923	+++	+++	++	+	+	+	++	+	+
962	++	+++	++	+	+	+	++	+	+
976	++	+++	++	+	+	++	++	+	+
1705	++	+++	++	+	+	+	++	+	+
1707	++	+++	++	+	+	+	++	+	+
1790	+++	+++	++	+	+	++	++	+	+
1794	++	+++	++	+	+	++	++	+	+

Примітка. «+» – слабка реакція; «++» – помірна реакція; «+++» – сильна реакція.

Таблиця 2

Якісні кольорові реакції на наявність ферментів окислювального комплексу на середовищах різного складу у штамів *Gr. frondosa*

Штам	Лаказа				Тирозиназа			
	СА	КГА	СН	СС	СА	КГА	СН	СС
332	++	++	++	++	-	-	-	-
923	++	++	++	++	-	-	-	-
962	-	-	-	-	-	-	-	-
976	-	-	-	-	-	-	-	-
1705	-	-	-	-	-	-	-	-
1707	++	++	++	++	+	+	+	+
1790	+	+	+	+	+	+	+	+
1794	+	+	+	+	-	-	-	-

Примітка. «-» – відсутність ферментативної реакції; «+» – слабка реакція; «++» – помірна реакція; «+++» – сильна реакція.

У ході дослідження штамів було встановлено, що прояв окислювальних ферментів залежав від штаму та практично не залежав від складу середовища.

Позитивна реакція на лаказу була встановлена у штамів 332, 923, 1707, 1790, 1794 на всіх середовищах.

Штами 1707 та 1790 виявили також і наявність тирозинази. Пероксидаза в досліджуваних штамів виявлена не була.

Вплив температури на окислювальні ферменти виявлявся тільки в швидкості прояву відповідної реакції. Зокрема, при температурі $+28^{\circ}\text{C}$ позитивна реакція проявлялася через 30–40 хв, що в 1,5–2 рази швидше ніж при температурі $+20^{\circ}\text{C}$.

Найповільнішими були якісні ферментативні реакції при температурі $+4^{\circ}\text{C}$, які виявлялися через 5–6 год.

Отже, аналіз отриманих результатів свідчить про наявність у *Gr. frondosa* таких ферментів:

- амілази;
- протеази;
- полігалактуронази;
- пектаттрансєлімінази;
- глюкозидази;
- уреази;

- ксиланази;
- ліпази;
- целюлази.

Виявлено також штам-специфічний прояв якісних кольорових реакцій на лаказу та тирозиназу, що не залежить від складу агаризованого живильного середовища.

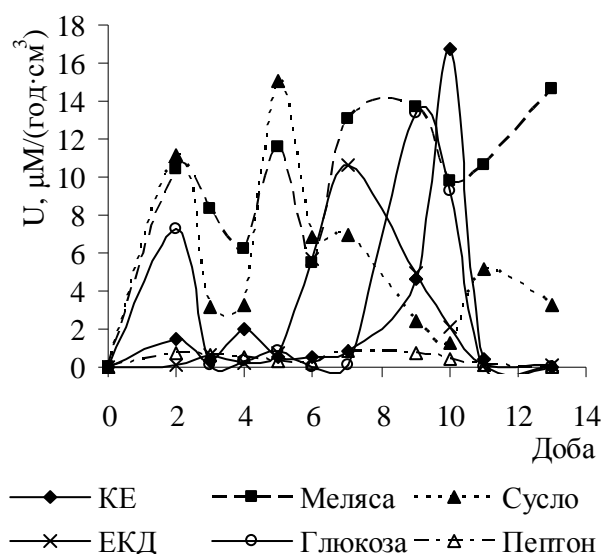
Оптимальна для росту міцелію температура $+28^{\circ}\text{C}$ сприяла прискоренню ферментативної реакції. Натомість нижчі температури $+20$ та $+4^{\circ}\text{C}$ сповільнювали її проходження в 1,5–2 та 10–12 раз відповідно.

За результатами досліджень для подальшої роботи в глибинній культурі обрано штам *Gr. frondosa* 332 та 962.

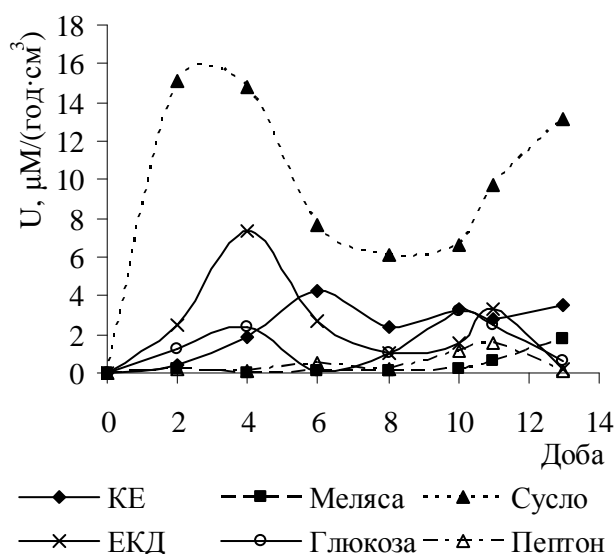
Наступним етапом було дослідження активності таких ферментів, як ендо-1,4- β -глюканази, екзоглюканази та монофенолнооксигенази у процесі культивування двох обраних штамів *Gr. frondosa* на рідких комплексних живильних середовищах.

Динаміка ендо-1,4- β -глюканази (КМЦ-активність) у штамів мала складний характер протягом усього дослідженого терміну культивування (13 діб).

Вища активність цього ферменту в обох штамів спостерігалася на середовищах, що містили сусло, КЕ та ЕКД (рис. 1).



а



б

Рис. 1. Динаміка КМЦ-активності екзоклітинних ферментів штамів 332 (а) та 962 (б) *Gr. frondosa*

Максимальні значення припадали на різний термін культивування і становлять 10,6–16,7 та 4,2–15,1 $\mu\text{M}/(\text{год}\cdot\text{см}^3)$.

При цьому найбільша активність ендоглюканаз спостерігалася у штамів 332 та 962 на середовищі з КЕ:

– $(16,7\pm 0,6) \mu\text{M}/(\text{год}\cdot\text{см}^3)$ на десятю добу у штаму 962;

– $(15,1\pm 0,7) \mu\text{M}/(\text{год}\cdot\text{см}^3)$ на другу добу у штаму 332.

Пептон виявився несприятливим для проявлення ендоглюканазної активності – до $(1,6\pm 0,1) \mu\text{M}/(\text{год}\cdot\text{см}^3)$.

На середовищах з глюкозою та мелясою було виявлено штамову різницю в проявленні КМЦ-активності:

– з глюкозою $(13,4\pm 0,2) \mu\text{M}/(\text{год}\cdot\text{см}^3)$ та з мелясою $(13,7\pm 0,4) \mu\text{M}/(\text{год}\cdot\text{см}^3)$ на дев'яту добу у штаму 332;

– з глюкозою $(3,2\pm 0,1) \mu\text{M}/(\text{год}\cdot\text{см}^3)$ на десятю добу і з мелясою $(1,8\pm 0,2) \mu\text{M}/(\text{год}\cdot\text{см}^3)$ на тринадцяту добу у штаму 962.

Наведені результати свідчать про те, що КМЦ-активність залежить від складу живильного середовища і має вищі значення на середовищах, що містять полісахаридні компоненти, які є індукторами ендо-1,4- β -глюканаз.

Штамові особливості виявлялися тільки на середовищах із джерелами вуглецю у вигляді моно- та дисахаридів.

Активність екзоглюканаз у *Gr. frondosa* на цих комплексних середовищах майже не виявлялася і становила до $0,4\text{--}0,5 \mu\text{M}/(\text{год}\cdot\text{см}^3)$.

Монофенолмонооксигеназна активність, хоча й проявлялася, була незначною – слабе посиніння субстрату (бензидин), спостерігалася через 1–2 год інкубування з культуральним фільтратом.

Дослідження вмісту редукуючих речовин у культуральному фільтраті у процесі вирощування на комплексних живильних середовищах (рис. 2) показало, що хоча в результаті споживання джерел вуглецю відбувається поступове зниження їх кількості, спостерігається тимчасове збільшення вмісту редукуючих речовин у культуральній рідині. Це явище пояснюється, як різним складом живильних середовищ, так і розкладанням складних органічних сполук, в першу чергу полісахаридів, в декілька етапів, з утворенням редукуючих моноцукрів. Таке збільшення концентрації редукуючих речовин у культуральному середовищі відбувається одночасно з підвищенням активності досліджених целюлолітичних ферментів:

– ендо-1,4- β -глюканаз;

– екзоглюканаз.

Інший характер динаміки вмісту редукуючих речовин спостерігався на середовищі з пептоном, де спочатку, протягом перших двох діб культивування, відбувалося підвищення їх концентрації з $(17,3\pm 0,1)$ до $(23,4\text{--}24,2) \text{г}/\text{дм}^3$, а потім поступове зменшення до значень, близьких до вихідних $(15,8\text{--}16,9 \text{г}/\text{дм}^3)$. Такий ефект пов'язаний з тим, що джерелами вуглецю в цьому випадку є переважно білки, пептиди та амінокислоти, які у процесі розкладання не утворюють редукуючі цукри, що визначаються методом Хагедорна–Йенсена.

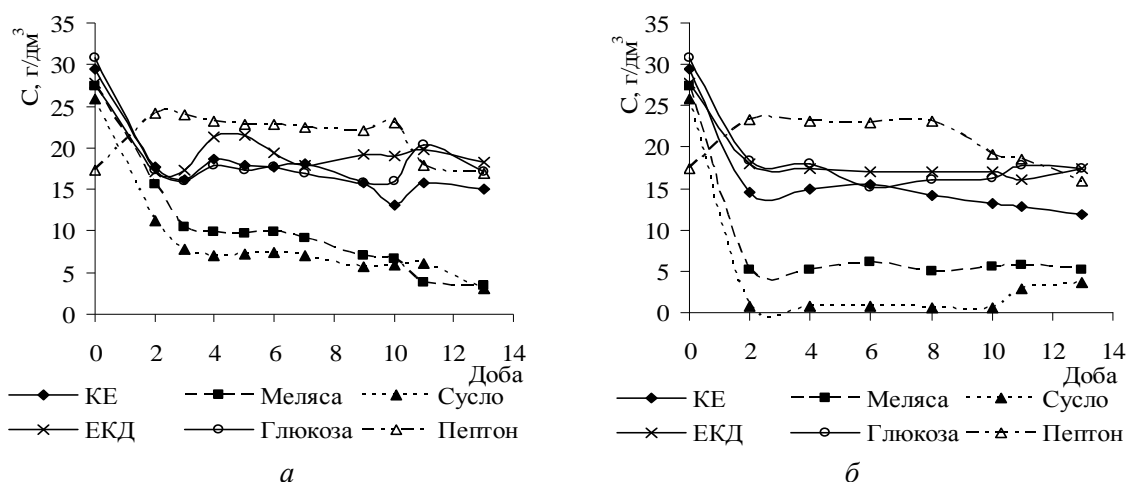


Рис. 2. Динаміка концентрації редукуючих речовин в культуральному фільтраті штамів 332 (а) та 962 (б) *Gr. frondosa*

Ступінь споживання редукуючих речовин найвищий на середовищах з суслом (85,9–88,0%) та мелясою (80,9–87,2 %), що в 2–2,5 рази більше ніж на середовищах з КЕ, ЕКД та глюкозою.

Отже, прояв та рівень активності целюлолітичних і окислювальних ферментів, а також динаміка концентрації редукуючих речовин у культуральному фільтраті залежать, в першу чергу, від складу середовища та пов'язані з наявністю речовин-індукторів і хімічною природою сполук, що є джерелами вуглецю для гриба.

Висновки

Проведено дослідження спектру та активності ферментів гідролітичного комплексу при культивуванні вищого базидіального гриба *Gr. frondosa* на агаризованих та рідких середовищах різного складу.

За допомогою якісних кольорових реакцій на агаризованих середовищах у всіх штамів виявлено такі ферменти:

- амілаза;
- казеїн аза;
- полігалактуроназа;
- пектаттрансєліміназа;
- глюкозидаза;
- уреаза;
- ксиланаза;
- ліпаза;
- ендоглюканаза.

Установлено, що прояв окислювальних ферментів лакази та тирозинази залежав від штаму й не залежав від складу середовища.

Оптимальна для росту міцелію температура +28°C сприяла прискоренню ферментативної реакції, тоді як нижчі температури +20 та +4°C тільки сповільнювали її проходження в 1,5–2 та 10–12 разів відповідно.

Виявлено, що у ході глибинного культивування на комплексних живильних середовищах наявна штампспецифічна активність енд-1,4-β-глюканази на середовищах з глюкозою та мелясою ($13,4 \pm 0,2$) μМ/(год·см³) відповідно на дев'яту добу ($13,7 \pm 0,4$) μМ/(год·см³) у штаму 332 та ($3,2 \pm 0,1$) μМ/(год·см³) на десяту добу і ($1,8 \pm 0,2$) μМ/(год·см³) на тринадцяту добу у штаму 962 та схожий характер динаміки цього ферменту на інших середовищах.

Активність екzogлюканази та монофенолмоноксигенази у *Gr. frondosa* на цих комплектуючих середовищах майже не проявлялася.

Оцінювання наявності та рівня активності гідролітичних ензимів свідчить про переважний вплив компонентів живильного середовища на ферментативну активність у *Gr. frondosa*.

Штамові біохімічні особливості проявляються у випадку окислювальних ферментів на агаризованих середовищах та для активності енд-1,4-β-глюканази на рідких середовищах з глюкозою та мелясою.

Аналіз отриманих результатів свідчить про те, що незважаючи на порівняно невелику ферментативну активність *Gr. frondosa*, цей гриб має високу фізіологічну активність на запропонованих середовищах, що містять відходи сільськогосподарської переробної галузі (КЕ та меляса). Тому пропонується отримання міцеліальної біомаси, біологічно активних екзопродуктів та посівного матеріалу для вирощування їстівних плодових тіл з застосуванням саме таких середовищ.

Література

1. *Kinetic characterization of lysine-specific metalloendopeptidases from Grifola frondosa and Pleurotus ostreatus fruiting bodies* / T. Nonaka, N. Dohmae, Y. Hashimoto, K. Takio // J. Biochem. – Tokyo. – 1998. – Vol. 124, No 1. – P. 157–162.
2. *Abe M. Proteases of Maitake (Grifola frondosa) Responsible for breakdown of Wheat flour dough and their reaction with gluten proteins* / M. Abe, M. Seguchi // Bioscience Biotechnology Biochemistry. – 2003. – Vol. 67, No 9. – P. 2018–2021.
3. *Debittering of enzymatic hydrolysates using an aminopeptidase from the edible basidiomycete Grifola frondosa* / T. Nishiwaki, S. Yoshimizu, M. Furuta, K. Hayashi // J. Biosci. Bioeng. – 2002. – Vol. 93. – No 1. – P. 60–63.
4. *Purification and characterization of a novel prolyl aminopeptidase from Maitake (Grifola frondosa)* / K. Hiwatashi, K. Hori, K. Takahashi, et al. // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2004. – Vol. 68, No 6. – P. 1395–1397.

5. *Purification and Characterization of a Trehalose Synthase from the Basidiomycete Grifola frondosa* / K. Saito, T. Kase, E. Takahashi et al. // *Appl. and Env. Microb.* – 1998. – Vol. 64, No 11. – P. 4340–4345.

6. *Grifolisin*, a member of the sedolisin family produced by the fungus *Grifola frondosa* / N. Suzuki, K. Nishibori, Y. Oodaira, et al. // *Phytochemistry*. – 2005. – Vol. 66, No 9. – P. 983–990.

7. *Isikhuemhen O.S.* Lignin, cellulose and hemicellulose degrading enzyme production by selected Polypores grown on wheat straw / O.S. Isikhuemhen, N.A. Mikiashvili, A. Gooding // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. – 2007. – Vol. 9, No 3/4. – P. 242–243.

8. *Molitoris H.P.* Physiology of marine fungi. A screening program for marine fungi / H.P. Molitoris, K. Schaumann // *The biology of marine fungi* // eds. S.T. Moss. – Cambridge: Cambridge University Press, 1986. – P. 35–47.

9. *Бухало А.С.* Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / А.С. Бухало. – К.: Наук. думка, 1988. – 144 с.

10. *Методы экспериментальной микологии: справ.* // И.А. Дудка, С.П. Вассер, И.А. Элланская и др. – К.: Наук. думка, 1982. – 561 с.

11. *Тодоров И.И.* Клинические лабораторные исследования в педиатрии / И.И. Тодоров. – София: Медицина и физкультура, 1968. – 230 с.

12. *Гавриленко В.Ф.* Большой практикум по физиологии растений / В.Ф. Гавриленко, М.Е. Ладыгина, Л.М. Хандобина. – М.: Высш. шк., 1975. – С. 284–285.

Стаття надійшла до редакції 10.01.2011.